

Y.S.CHANG & ASSOCIATES

K.P.O.BOX 136, SEOUL 110, KOREA

Member : AIPPI APAA LES
Fax : (82-2) 556-5877 / 5969
Phone : 556-8221 ~ 556-0461
Telex : 24928 (YSCHANG)

FILE COPY

提出書類写本

Kind of protection : PATENT

Applicant : NOVO NORDISK A/S

Title : A Method of Preparing a Variant of
a Lipolytic Enzyme

Encl	Document filed	Filing Date	Kor. Appln. No.
	Application 出願書		
	Petition for Exam 出願審査請求書		
	Power of Attorney 委任状		
X	Priority Document 優先権主張書類	October 11, 1996	96-704602
	Argument 意見書		
	Amendment 補正書		
	Printed Matter 審査参考資料		
	Appeal 抗告審判請求書		
Your Ref.No.		4153.204-KR, LiAS/KHgh	
Our Ref.No.		DK-6P-0825	

張龍植特許法律事務所
韓国 Seoul 光化門郵便局私書函136号

TRANSLATION

Submission of Priority Document

Applicant	NOVO NORDISK A/S Novo Allé DK-2880 Bagsvaerd Denmark			
Attorney	Y. S. Chang	Code of Attorney	K020	
Application No. and Date	Application No. : 96-704602 Application Date : August 22, 1996			
Title of Invention	A Method of Preparing a Variant of a Lipolytic Enzyme			
Particulars of the Priority Document	Country	Kind of Appln.	Filing Date	Filing No.
	Denmark	Patent	Feb. 22, 1994	0217/94
<p>We are filing this Priority Document pursuant to Article 54 (4) of the Korean Patent Law.</p> <p>Date : October 11, 1996</p> <p>Y. S. Chang Patent Attorney</p> <p>To : Commissioner Korean Industrial Property Office</p>				
Attached Document:	1. Translation of Danish Priority Document		1 copy	

접수인란		(특 허)우선권증명서류제출서		방식 심사 란	답 당	심사관
출원인	성 명	노보 노르디스크 아크티에 쉘스카브 대표자 안네 제케르				
	주 소	덴마아크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레				
	국 적	덴마아크				
대리인	성 명	변리사 장 용 식, 정 진 상	대리인코드	K020, K184		
	주 소	서울특별시 강남구 역삼동 824-20 (전화번호 : 556-8224~6)				
출원의 표 시	출원번호	1996년 특허출원 제 704602 호				
	출원일자	1996년 8월 22일				
발 명 의 명 칭		지질분해효소의 변이체 제조방법				
우선권주장서류의 표 시	출 원 국 명	출원의 종류	출 원 일 자	출 원 번 호		
	덴 마 아 크	특 허	1994. 2. 22.	0217/94		
<p>특허법 제54조 제4항·실용신안법 제11조·의장법 제23조 제4항 및 상표법 제20조 제4항의 규정에 의하여 위와 같이 우선권증명서류를 제출합니다.</p> <p>1996년 10월 11일</p> <p>대리인 변리사 장 용 식</p> <p>특 허 청 장 귀하</p>						
<p>첨부서류 :</p> <p>1. 덴마아크 우선권서류 번역문 1통</p>						



REC'D	22 MAR 1995
WIPO	PCT

Kongeriget Danmark

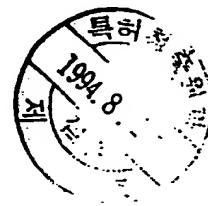
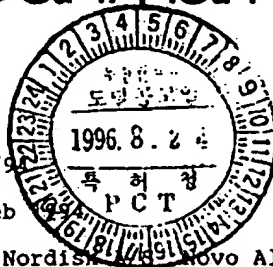
Patent application No.:

0217/95

Date of filing:

22 Feb

Applicant:

Novo Nordisk, Novo Allé, 2880 Bagsværd,
DK

This is to certify the correctness of the following information:

The attached photocopy is a true copy of the following document:

- The specification, claims and drawings as filed with the application on the filing date indicated above.



PRIORITY DOCUMENT

Erhvervsministeriet
Patentdirektoratet



TAASTRUP 13 Mar 1995

Gurli Brehmer
Gurli Brehmer
Kontorfuldmægtig

덴 마 크 특 허 청

출 원 번 호 : 0 2 1 7 / 9 4

출 원 일 자 : 1994년 2월 22일

출 원 인 : 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브
덴마아크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레

발명의명칭 : 리파제 변이체 및 그것의 제조방법

첨부된 사본은 출원한 것과 동일한 명세서와 도면임.

1995년 3월 13일

담당관 굴리 브레머

위 번역문은 원본과 상위없음
변리사 장 용 식

명 세 서

리파제 변이체 및 그것의 제조방법

발명의 상세한 설명

발명의 분야

본 발명은 모리파제의 신규의 변이체, 변이체를 암호화하는 DNA 구조물, 변이체 제조 방법 및 변이체로 이루어지는 세제 또는 식기세척 조성물에 관한 것이다.

발명의 배경

다년간 지질분해효소는 세제효소, 즉 의복 및 다른 직물로부터 지질 또는 지방 얼룩을 제거하기 위한 것으로 사용되어 왔다.

예를 들어서, 다양한 미생물 리파제가 세제효소로 제안되어 왔다.

그러한 리파제의 예로는 EP 258 068과 EP 305 216에 기술된 *Humicola lanuginosa* 리파제, EP 238 023에 기술된 *Rhizomucor miehei* 리파제, EP 214 761에 기술된 *C. antarctica* 리파제 A 또는 B와 같은 *C. antarctica* 리파제 같은 *Candida* 리파제, EP 218 272에 기술된 *P. alcaligenes* 및 *P. pseudoalcaligenes* 리파제, EP 331 376에 기술된 *P. cepacia* 리파제 같은 *Pseudomonas* 리파제, *B. subtilis* 리파제(Dartois et al., 1993), *B. stearothermophilus* 리파제(JP 64/744992) 및 *B. pumilus* 리파제(EP 91 00664)같은 *Bacillus* 리파제를 포함한다.

더구나, 많이 클론화된 리파제는 야마구치(Yamaguchi, S. et al., 1991)에 의해 기술된 *Penicillium camembertii* 리파제, *Geotricum candidum* 리파제(Schimada, Y. et al., 1989), 그리고 *R. delemar* 리파제(Hass, M.J et al., 1991), *R. niveus* 리파제(Kugimiya, W. 1992) 및 *R. oryzae* 리파제와 같은 다양한 *Rhizopus* 리파제를 포함하는 많은 클론화된

리파제가 기술되어 왔다.

세제 효소로 제안되고 있는 지질분해효소의 다른 유형은 예를들면 WO 88/09367에 기술된 것과 같은 *Pseudomonas mendocina*로부터 유도된 쿠티나제, 또는 *Fusarium solani pisi*(WO 90/09446에 기술됨)로부터 유도된 쿠티나제를 포함한다.

근년에 세제 목적을 위해 개선된 성질을 갖는 리파제 변이체를 제조하기 위한 시도가 행해졌다. 예를 들어, WO 92/05249는 생형 리파제 효소의 일정한 특성이 그것들의 아미노산 서열의 특이적, 즉 부위-지정된 변형에 의해 변화된 개선된 성질을 갖는 리파제 변이체를 개시한다. 보다 구체적으로, 모 리파제의 소위 지질 접촉대의 하나 이상의 아미노산 잔기가 변형되어진 리파제 변이체가 기술되어 있다.

PCT/DK93/00225는 리파제의 중요한 위치를 차지하는 아미노산 잔기가 변형되어진 개선된 성질을 갖는 리파제 변이체를 기술한다.

EP 407 225는 구체적으로 정의된 아미노산 변형에 의해 제조되어진 단백질 분해 효소에 대해 개선된 내성을 갖는 리파제 변이체를 기술한다.

EP 260 105는 활성부위로부터 15Å 내의 아미노산 잔기가 치환된 가수분해 효소를 기술한다.

본 발명의 목적은 개선된 세탁 및/또는 식기세척성능을 갖는 새로운 리파제를 제조하는 것이다.

발명의 개시

이제 본 발명자는 모 효소와 비교하여 개선된 세척 및/또는 식기세척성능을 갖는 지질 분해효소의 변이체의 새로운 제조방법을 개발하였다. 이 방법은 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열의 임의적 또는 국소화된 임의적 돌연변이유발을 기초로 한다.

따라서, 첫 번째 양태에서 본 발명은 아미노산 잔기 21-27, 145-147, 174 또는 226-227에 의해 정의된 부위중 적어도 한 곳에서의 돌연변이(결실 또는 삽입 포함)를 지니는,

균주 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제 또는 상기 리파제의 유사체의 변이체에 관한 것이다.

두 번째 양태에서 본 발명은 다음의 위치중 적어도 한 곳에서의 돌연변이(결실 또는 삽입포함)로 이루어지는 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제 또는 그의 유사체의 변이체에 관한 것이다:

S83, E87, N94, A121, D167, R205.

바람직하게, 본 발명의 양태에 따른 변이체는 다음의 돌연변이중 적어도 하나로 이루어진다:

S87T, E87K, N94K, A121V, D167G, R205K.

본 발명의 다른 양상은 다음의 돌연변이중 적어도 하나로 이루어지는 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제 또는 그것의 유사체의 변이체에 관한 것이다.

N94K+D96A
S83T+N94K+D96N
E87K+D96V
E87K+G91A+D96A
N94K+F95L+D96H
A121V+R205K+E210Q
F95C+D96N
G91S+L93V+F95C
E87K+G91A+D96R+I100V
E87K+G91A
S83T+E87K+Q249R
S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
D167G+E210V

이들 변이체는 칼슘에 대해 감소된 내성 및/또는 비이온성 계면활성제로 알코올 에톡실레이트 같은 세제 성분에 대해 내성을 나타내는 것으로 밝혀졌고, 따라서 세제 또는 식기세척 목적을 위한 구체적인 용도가 생각된다.

본 명세서에서, "얻을 수 있는"은 문제의 유기체의 균주에 의해 생산된 효소를 가리킬

뿐만 아니라 그러한 균주에서 분리된 DNA서열에 의해 암호화되고 상기 DNA서열로 형질전환된 숙주 유기체에서 생산된 효소를 가리킴을 뜻한다.

본문에서 "유사체"란 용어는, 하나이상의 아미노산 잔기가 *H. lanuginosa* 리파제의 것과 다른 아미노산 서열로 이루어지며, 상기 리파제의 아미노산 서열과 적어도 70% 상동성, (2개의 서열 사이의 동일한 정도로 측정), 예를들어 적어도 75%, 80%, 90%, 또는 95% 상동성이고, 면역학적으로 상기 리파제와 교차반응성이고 및/또는 상기 리파제의 아미노산 서열 또는 상기 리파제를 암호화하는 DNA 서열을 기초로 제조된 올리고뉴클레오타이드 탐침과 혼성화하는 DNA 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 포함함을 뜻한다.

유사체는 *H. lanuginosa* 리파제의 유도체일 수 있는데, 이것은 예를들어 리파제의 N- 및 C-말단부 중의 하나 또는 둘다에 하나이상의 아미노산 잔기의 첨가, 아미노산 서열의 하나이상의 다른 부위에서 하나이상 아미노산 잔기의 치환, 리파제의 단부중의 하나 또는 둘다 또는 아미노산 서열의 하나이상의 부위에서 하나이상의 아미노산 잔기의 결실, 또는 아미노산 서열의 하나이상의 부위에서 하나이상의 아미노산 잔기의 삽입을 가져오는 리파제를 암호화하는 DNA 서열을 변형함으로써 제조된다. DNA 서열의 변형은 부위 지정 또는 임의적 돌연변이유발 또는 공지의 방법을 따른 이들 기술의 조합에 의해 실행될 수 있다.

더구나, 유사체는 상기 "발명의 배경" 단원에서 언급된 것중의 하나와 같은 또다른 유기체로부터 유도된 폴리펩티드일 수 있다.

관련 올리고뉴클레오타이드 탐침(들)을 갖는 모 *H. lanuginosa* 리파제의 유사체를 암호화하는 DNA 서열의 혼성화는 DNA 서열을 혼성화되게 하는 어떤 적당한 조건 하에서 시행될 수 있다. 예를들어, 그러한 조건은 명시된 조건, 예를들어 5 x SSC에 미리 담그고 20% 포름아미드, 5 x 덴하르트 용액, 50mM 인산나트륨, pH 6.8, 및 50 μ g

의 변성된 초음파로 분해된 송아지 흉부 DNA의 용액에서 $\sim 40^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간동안 예비 혼성화시키고, 이어서 $\sim 40^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간동안 $100\mu\text{M}$ ATP로 보충된 동일한 용액에서 혼성화를 수반하는 조건하에서의 혼성화이거나 또는 예를들어 Sambrook 등(et al., 1989)에 의해 기술된 다른 방법이다.

H. lamuginosa 리파제의 유사체의 면역학적인 교차반응성은 정제된 리파제의 적어도 한 에피토프(epitope)에 대하여 길러지거나 또는 그것과 반응성인 항체를 사용하여 분석될 수 있다. 단클론성 또는 다클론성일 수도 있는 항체는 이 기술분야의 공지의 방법, 예를들어 Hudson 등(et al., 1989)에 의해 기술된 방법으로 제조된다. 면역학적인 교차 반응성은 이 분야의 공지의 분석법을 사용하여 측정될 수 있고, 이 예는 Hudson 등(et al., 1989)에 의해 기술된 바와 같은 Western Blotting 또는 방사 면역확산 분석법이다.

또 다른 양상에서 본 발명은 상기한 변이체를 암호화하는 돌연변이된 DNA서열로 이루어지는 DNA구조물, DNA구조물을 운반하는 재조합 발현벡터, DNA구조물 또는 벡터로 형질전환되는 세포뿐만 아니라 변이체의 생산을 돕는 조건하에서 상기 세포를 배양함으로써 모리파제의 변이체를 생산하고 난 후 변이체를 배양물에서 회수하는 방법에 관한 것이다.

최종양상에서 본 발명은 세제 효소로서, 보다 구체적으로 세탁 또는 식기세척에 본 발명의 변이체의 사용, 그리고 변이체로 이루어지는 세제첨가제 및 세제 조성물에 관한 것이다.

발명의 변이체를 정의하는데 사용된 명명법

쉽게 참고하기 위해 본 발명의 특정 변이체들은 다음의 명명법을 사용하여 기술한다.

원래의 아미노산(들): 위치(들): 치환된 아미노산(들)

이 명명법에 따르면, 예를들어 96 위치에서 아스파르트산을 발린으로 치환하는 것은 다음과 같이 나타낸다:

Asp 96 Val 또는 D96V

동일한 위치에서 아스파르트산의 결실은 다음과 같이 나타낸다:

Asp 96* 또는 D96*

및 리신 같은 추가의 아미노산 잔기의 삽입은 다음과 같이 나타낸다:

Asp 96 ValLys 또는 D96VK

다수의 돌연변이는 플러스 부호로 분리한다, 즉:

Asp 96 Val + Glu 87 Lys 또는 D96V + E87K

는 96 및 87 위치에서 각각 아스파르트산 및 글루탐산을 발린 및 리신으로 치환하는 돌연변이를 나타낸다.

하나이상의 대안의 아미노산 잔기가 주어진 위치에서 삽입될 때 이것은 다음과 같이 나타낸다.

D96V, N 또는

D96V 또는 D96N

더 나아가서, 어떤 특정 변형을 제안하지 않고 변형하기 적당한 위치를 확인할 때 어떤 아미노산 잔기도 그 위치에 존재하는 아미노산 잔기를 치환할 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 예를들어, 96 위치에서, 명시하지는 않으나 아스파르트산의 변형을 말할 때, 아스파르트산은 결실되거나 또는 어떤 다른 아미노산, 즉 R, N, A, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V, 또는 그 위치에서 삽입된 더이상의 아미노산 잔기를 치환할 수 있다.

최종적으로, 모 H. lanuginosa 리파제의 돌연변이를 여기서 확인할 때(상기 정의한 바와 같은)상기 리파제의 유사체의 유사돌연변이를 포함하는 것으로서 이해됨을 뜻한다.

발명의 변이체의 구성

본 발명에 따라 임의적 돌연변이유발을 받게 되는 모 지질분해효소를 암호화하는

DNA 서열은 이 기술분야에서 공지된 방법의 사용으로 문제의 모효소를 생산하는 어떤 세포 또는 미생물로부터 분리될 수 있다.

예를 들어, DNA 서열은 서열을 품고 있는 것으로 예상되는 유기체로부터 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 확립하고, 종래의 방법으로 양성의 클론을 스크리닝함으로써 분리될 수 있다. 그러한 방법의 예는 표준 기술(참고, Sambrook et al, 1989)에 따른 모효소(서열정보가 유용한 경우) 또는 관련 지질분해효소(모효소에 관한 서열정보가 유용하지 않은 경우)의 아미노산 또는 DNA 서열을 기초로 하여 제조된 올리고뉴클레오타이드 탐침과의 혼성화, 및/또는 리파제 활성 같은 지질분해활성을 발현하는 클론을 선택, 및/또는 모 지질분해효소에 대해 길러진 항체와 반응성인 단백질을 제조하는 클론을 선택하는 것이다.

cDNA 또는 게놈 라이브러리로부터 본 발명에 따라 변형시킬 모 지질분해효소를 암호화하는 DNA 서열을 분리하는 바람직한 방법은 모 효소의 DNA 또는 아미노산 서열을 기초로 하여 제조된 축퇴의 올리고뉴클레오타이드 탐침을 사용하는 폴리머라제 연쇄반응(PCR)의 사용에 의한 것이다. 예를 들어, PCR은 US 특허 제 4,683,202호 또는 R.K. Saiki 등(et al., (1988))에 의해 기술된 기술을 사용하여 수행될 수 있다.

대안으로, 모효소를 암호화하는 DNA 서열은 확립된 표준 기술, 예를 들어 Beaucage 및 Caruthers에 의해 기술된 포스포아미디트 방법(1981), 또는 Matthes 등(et al., 1984)에 의해 기술된 방법에 의해 합성에 의해 제조될 수 있다.

포스포아미디트 방법에 따라서, 올리고뉴클레오타드는 예를 들어 자동 DNA 합성기에서 합성되고, 정제되고, 어니일링되고, 연결되어 적당한 벡터에서 클론화된다.

최종적으로, 모효소를 암호화하는 DNA 서열은 (적당한 대로) 합성, 게놈 또는 cDNA 기원의 단편, 표준기술에 따라서 모효소를 암호화하는 전체 DNA 서열의 다양한 부분에 대응하는 단편을 연결함으로써 제조된, 혼합된 게놈 및 합성, 혼합된 합성 및 cDNA

또는 혼합된 게놈 및 cDNA 기원의 DNA로부터 제조될 수 있다.

본 발명의 변이체의 구조물은 실시예 1-3에서 더 예시된다.

본 발명의 변이체의 발현

본 발명에 따르면, 상기 기술한 방법, 또는 이 분야의 어떤 대안의 공지 방법에 의해 제조된 변이체 지질분해효소를 암호화하는 돌연변이된 DNA 서열은 촉진 유전자, 작동 유전자, 리보솜 결합부위, 번역개시신호, 및 임의로 억제유전자 또는 다양한 활성유전자를 암호화하는 제어서열을 일반적으로 포함하는 발현 벡터를 사용하여 효소 형태에서 발현될 수 있다.

본 발명의 변이체를 암호화하는 DNA 서열을 수반하는 재조합 발현 벡터는 재조합 DNA 과정을 편리하게 시킬 수 있는 어떤 벡터일 수 있고, 벡터의 선택은 도입할 숙주 세포에 종종 의존할 것이다. 따라서, 벡터는 자율적으로 복제하는 벡터, 즉 염색체외의 구성요소로 존재하는 벡터일 수 있고, 이것의 복제는 염색체 복제에는 독립적인데, 예를 들어 플라스미드, 박테리오파지 또는 염색체외 요소, 소형 염색체 또는 인공 염색체이다. 대안으로, 벡터는 숙주세포에 도입될 때 숙주세포게놈으로 합쳐지고 합쳐진 염색체(들)와 같이 복제되는 것일 수 있다.

벡터에서, DNA 서열은 적당한 촉진유전자 서열에 조작가능하게 연결되어야 한다. 촉진유전자는 선택한 숙주세포에서 전사 활성을 나타내는 어느 DNA 서열일 수 있고 숙주세포에 대해 상동적 또는 비상동적 중의 하나인 단백질을 암호화하는 유전자로부터 유도될 수 있다. 특히 박테리아 숙주에서, 본 발명의 변이체를 암호화하는 DNA 서열의 전사를 지정하는 적당한 촉진유전자의 예는, *E. coli*의 lac 오페론의 촉진유전자, *Streptomyces coelicolor* 아가라제 유전자 *dagA* 촉진유전자, 예를 들어 WO 93/10249에 기술된 *Bacillus licheniformis* α -아밀라제 유전자의 촉진유전자(*amyL*), *Bacillus stearothermophilus* 말토 아밀라제 유전자의 촉진유전자(*amyM*), *Bacillus amyloliquefaciens*

α -아밀라제의 촉진유전자(amyQ), *Bacillus subtilis* xylA 및 xylB 유전자등의 촉진 유전자이다. 균류의 숙주에서 전사를 위한 유용한 촉진 유전자의 예는 *A. oryzae* TAKA 아밀라제, *Rhizomucor miehei* 아스파르트 프로테이나제, *A. niger* 중성 α -아밀라제, *A. niger* 산 안정한 α -아밀라제, *A. niger* 글루코아밀라제, *Rhizomucor miehei* 리파제, *A. oryzae* 알칼리성 프로테아제, *A. oryzae* 트리오스 포스페이트 이성질화효소 또는 *A. nidulans* 아세트아미다제를 암호화하는 유전자로 유도된 것이다.

본 발명의 발현 벡터는 또한 적당한 전사 종식 유전자와, 진핵생물에서는 본 발명의 변이체를 암호화하는 DNA 서열에 조작가능하게 연결된 폴리아데닐화 서열로 이루어질 수 있다. 종식유전자 및 폴리아데닐화 서열은 촉진유전자와 같은 원천으로부터 적당히 유도될 수 있다.

벡터는 문제의 숙주세포에서 벡터가 복제되는 것을 가능하게 하는 DNA 서열을 더 포함할 수 있다. 그러한 서열의 예는 플라스미드 pUC19, pACYC177, pUB110, PE194, pAMB1 및 pIJ702의 복제의 기원이다.

또한, 벡터는 선택가능한 표시, 예를들어 *B. subtilis* 또는 *B. licheniformis*로부터의 dal 유전자 같이 유전자의 산물이 숙주세포 결합을 보충해주는 유전자, 또는 암피실린, 카나미신, 클로르암페니콜이나 테트라시클린 내성 같이 항생물질의 내성을 주는 것으로 이루어질 수 있다.

더구나, 벡터는 amdS, argB, niaD 및 sc 같은 *Aspergillus* 선택표시(표시는 히그로미신 내성을 일으킨다)로 이루어질 수 있고, 또는 선택은 예를들어 WO 91/17243에 기술된 바와 같은 공-형질전환에 의해 이루어질 수 있다.

세포내 발현이 어떤 점에서, 예를들어 숙주세포로서 어떤 박테리아를 사용할 때, 유리하게 될 수 있는 반면에, 발현은 세포밖에서 일어나는 것이 일반적으로 바람직하다. 모 지질분해효소는 본질적으로 배지로 발현된 효소의 분비를 허용하는 예비부위로

이루어질 수 있다.

원한다면, 이 예비부위는 다른 예비부위 또는 신호 서열에 의해 치환가능하고, 각 예비부위를 암호화하는 DNA 서열의 치환에 의해 편리하게 이루어질 수 있다.

모 지질분해효소의 변이체를 암호화하는 본 발명의 DNA 구조물, 촉진유전자, 종식 유전자 및 다른 요소를 연결하고 이것들을 복제하는데 필요한 정보를 함유하는 적당한 벡터로 삽입하기 위해 사용된 방법은 이 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다(참고로, 예를들어, Sambrook et al. (1989)).

상기 정의한 본 발명의 DNA 구조물 또는 발현벡터중의 하나로 이루어지는 본 발명의 세포는 본 발명의 모 지질분해효소의 변이체의 재조합 생산에서 숙주세포로 유리하게 사용된다. 세포는 편리하게는 숙주염색체에서 숙주 DNA 구조물을 통합함으로써 변이체를 암호화하는 본 발명의 DNA 구조물로 형질전환될 수 있다. 일반적으로 이런 통합은 DNA 서열이 세포안에서 더욱 안정하게 유지되기 쉽기 때문에 유리하다고 생각된다. 숙주 염색체로의 DNA 구조물의 통합은 종래의 방법, 예를들어 상동적 또는 비종적 재조합에 의해 실행될 수 있다. 대안으로, 세포는 숙주세포의 다른 유형과 관련하여 하기에 기술된 발현 벡터로 형질전환될 수 있다.

본 발명의 세포는 포유동물 또는 곤충같이 더 고등한 유기체의 세포일 수 있지만 미생물의 세포, 예를들어 박테리아 또는 균류(효모도 포함) 세포인 것이 바람직하다.

적당한 박테리아의 예는

Bacillus subtilis, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, 또는 *Streptomyces lividans* 또는 *Streptomyces murinus* 같은 그람양성의 박테리아, 또는 *E. coli* 같은 그람음성의 박테리아이다.

박테리아의 형질전환은 예를들어 원형질체 형질전환에 의해 또는 방법 자체는 알려진 방법으로 적당한 세포를 사용함으로써 실행할 수 있다.

효모 유기체는 유리하게는 *Saccharomyces* 또는 *Schizosaccharomyces*의 종, 예를들어 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 선택될 수 있다. 사상균은 *Aspergillus*의 종, 예를들어 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* 또는 *Aspergillus nidulans*에 유리하게 속한다. 사상균 세포는 방법 자체는 알려진 방법으로 원형질체 형성 및 원형질체의 형질전환과 이어서 세포벽의 재생을 포함하는 방법으로 형질전환될 수 있다.

Aspergillus 숙주세포의 형질전환을 위한 적당한 방법은 EP 238 023에 기술되어 있다.

또다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 모 지질분해효소의 변이체를 만드는 방법에 관한 것인데, 이 방법은 변이체의 제조를 돕는 조건하에서 상기 기술된 바와 같은 숙주 세포를 배양하고 세포 및/또는 배지에서 변이체를 회수하는 것으로 이루어진다.

세포를 배양하기 위해 사용된 배지는 문제의 숙주세포를 성장시키고 본 발명의 모 지질분해효소의 변이체의 발현을 얻기 위한 적당한 어떤 종래의 배지일 수 있다. 적당한 배지는 시중 공급자에게서 입수하거나 또는 공개된 방법에 따라 제조될 수 있다 (예를들어 어메리칸 타입 쿨처 콜렉션의 카탈로그에서).

숙주세포로부터 분리된 본 발명의 변이체는 원심분리 또는 여과에 의해 세포를 배지로부터 분리시키고, 황산암모늄같은 염으로 배지의 단백질의 성분을 침전시키고, 이어서 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등 같은 크로마토그래피의 방법을 포함하는 공지의 방법에 의해 배지로부터 편리하게 회수할 수 있다.

식기세척 및 세탁을 위한 세제 첨가제와 조성물

본 발명의 변이체의 칼슘에 대한 감소된 의존성 및/또는 세제 성분에 대해 개선된 내성때문에, 변이체는 세제조성물, 예를들어 pH 7-13의 범위, 보다 구체적으로 pH 8-11의 범위에서 그 성능을 나타내도록 한 세제 조성물에 보충하는데 특히 적당하다.

세제조성물

본 발명에 따라서, 본 발명의 리파제 변이체는 전형적으로 세제 조성물의 성분일 수 있다. 그 자체로서 비-분진성 과립상, 안정화된 액체, 또는 보호된 효소의 형태의 세제 조성물에 포함될 수 있다.

비-분진성 과립상은 예를들어 US 4,106,991 및 4,661,452(둘다 Novo Industri A/S임)에 기술된 바와 같이 제조되고 임의로 이 분야의 공지 방법에 의해 코팅될 수 있다.

왁스 코팅 재료의 예는 평균 분자량이 1000-20000인 폴리(에틸렌옥시드) 제품(폴리 에틸렌글리콜, PEQ); 16-50 에틸렌옥시드 단위를 갖는 에톡시화된 노닐페놀; 알코올이 12-20개의 탄소원자를 함유하고 15-80개의 에틸렌옥시드 단위가 있는 에톡시화된 지방 알코올; 지방 알코올; 지방산; 지방산의 모노- 및 디- 및 트리글리세리드이다.

유동액 대 기술에 의한 이용에 적당한 필름-형성 코팅물질의 예는 특허 GB 1483591에 주어진다. 액체효소제제는 예를들어 확립된 방법에 따른 프로판글리콜같은 폴리올, 당 또는 당알코올, 락트산 또는 붕산을 첨가함으로써 안정화될 수 있다.

다른 효소 안정제는 이 분야에서 잘 알려져 있다.

보호된 효소는 EP 238,216에 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다.

본 발명의 세제조성물은 어떤 편리한 형태, 예를들어 분말, 과립, 페이스트 또는 액체 일 수 있다. 액체 세제는 전형적으로 70% 까지는 물이고 0-30%는 유기용매를 함유하는 수성, 또는 비수성일 수 있다.

세제 조성물은 하나이상의 계면활성제로 이루어지고, 이것의 각각은 음이온성, 비이온성, 양이온성, 또는 양성이온성일 수 있다.

세제는 보통 0-50%의 선형 알킬벤젠술포네이트(LAS), 알파-올레핀 술포네이트(AOS), 알킬술포네이트(지방알코올 술포네이트)(AS), 알코올 에톡시 술포네이트(AEOS 또는 AES),

2차 알칸술포네이트(SAS), 알파-술포 지방산 메틸에스테르, 알킬 또는 알케닐숙신산, 또는 비누같은 음이온성 계면활성제를 함유한다.

또한 0-40%의 알코올 에톡실레이트(AEO 또는 AE), 카르복실화된 알코올 에톡실레이트, 노닐페놀에톡실레이트, 알킬폴리글리코시드, 알킬디메틸아민옥시드, 에톡시화된 지방산 모노에탄올아미드, 지방산 모노에탄올아미드, 또는 폴리히드록시 알킬 지방산 아미드 (예를들어 WO 92/06154에 기술됨)같은 비이온성 계면활성제를 함유한다.

세제 조성물은 하나이상의 다른 효소로 추가로 이루어질 수 있는데, 이것은 아밀라제, 풀룰라나제, 쿠티나제, 프로테아제, 셀룰라제, 퍼옥시다제, 옥시다제, (예를들어 락카제) 및/또는 다른 리파제 같은 것이다.

세제는 1-65%의 세제 빌더, 또는 지올리트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 포스포네이트, 시트레이트, 니트릴로트리아세트산(NTA), 에틸렌-디아민테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTMPA), 알킬-또는 알케닐숙신산, 용해성 실리케이트 또는 충이진 실리케이트(예를들어 Hoechst로부터의 SKS-6) 같은 착화제를 함유할 수 있다. 또한 세제는 빌더첨가되지 않을 수도 있는데, 즉 본질적으로 세제 빌더가 없을 수도 있다.

세제는 하나이상의 중합체로 이루어질 수 있다.

예는 카르복시메틸셀룰로스(CMC), 폴리(비닐피롤리돈)(PVP), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리아크릴레이트 같은 폴리카르복실레이트, 말레산/아크릴산 공중합체 및 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체이다.

세제는 테트라아세틸에틸렌디아민(TAED) 또는 노나노일옥시벤젠술포네이트(NOBS) 같은 과산-형성 표백 활성제와 합해질 수 있는 과붕산염 또는 과탄산염 같은 H_2O_2 원천으로 이루어질 수 있는 표백제를 함유할 수 있다. 대안으로, 표백제는 예를들어 아미드, 이미드, 또는 술폰형의 퍼옥시산으로 이루어질 수 있다.

본 발명의 세제 조성물의 효소는 종래의 안정화제, 예를들어 프로필렌글리콜 또는 글리세롤 같은 폴리올, 당 또는 당알코올, 락트산, 붕산, 또는 예를들어 방향족 붕산 에스테르 같은 붕산 유도체를 사용하여 안정화될 수 있고, 조성물은 예를들어 WO 92/19709 및 WO 92/19708에 기술된 바와 같이 조제될 수 있다.

또한 세제는, 예를들어, 점토를 포함하는 식물 첨가제, 거품 촉진제, 거품 억제제, 부패방지제, 흙 현탁제, 흙 재침전방지제, 염료, 살균제, 증백제 또는 향료 같은 다른 종래의 세제 성분을 함유할 수 있다.

(사용 농도에서 수용액에서 측정된) pH는 보통 중성 또는 알칼리성, 예를들어 7-11의 범위일 것이다.

본 발명의 범위내에 있는 세제 조성물의 구체적인 형태는 다음을 포함한다.

(1) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	7	-	12%
알코올 에톡시술포네이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₈ 알코올, 1-2 EO) 또는 알킬술포네이트 (예를들어 C ₁₆₋₁₈)	1	-	4%
알코올 에톡실 레이트 (예를들어 C ₁₄₋₁₅ 알코올, 7 EO)	5	-	9%
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	14	-	20%
용해성 규산염 (Na ₂ O, 2SiO ₂)	2	-	6%
지올리트 (NaAlSiO ₄)	15	-	22%
황산나트륨 (Na ₂ SO ₄)	0	-	6%
시트르산나트륨/시트르산 (C ₆ H ₇ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇)	0	-	15%
과붕산나트륨 (NaBO ₃ ·H ₂ O)	11	-	18%
TAED	2	-	6%
카르복시메틸셀룰로스	0	-	2%
중합체(예를들어 말레산/아크릴산 공중합체,PVP, PEG)	0	-	3%
효소	0	-	5%
소량성분(예를들어, 거품억제제, 향료, 증백제, 광표백제)	0	-	5%

(2) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	6 - 11%
알코올 에톡시술포네이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₈ 알코올, 1-2 EO) 또는 알킬술포네이트 (예를들어 C ₁₆₋₁₈)	1 - 3%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₄₋₁₅ 알코올, 7 EO)	5 - 9%
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	15 - 21%
용해성 규산염 (Na ₂ O, 2SiO ₂)	1 - 4%
지올리트 (NaAlSiO ₄)	24 - 34%
황산나트륨 (Na ₂ SO ₄)	4 - 10%
시트르산나트륨/시트르산 (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇)	0 - 15%
카르복시메틸셀룰로스	0 - 2%
중합체(예를들어 말레산/아크릴산 공중합체, PVP, PEG)	1 - 6%
효소	0 - 5%
소량성분(예를들어, 거품억제제, 향료)	0 - 5%

(3) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	5	-	9%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO)	7	-	14%
지방산같은 비누 (예를들어 C ₁₆₋₂₂ 지방산)	1	-	3%
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	10	-	17%
용해성 규산염 (Na ₂ O, 2SiO ₂)	3	-	9%
지올리트 (NaAlSiO ₄)	23	-	33%
황산나트륨 (Na ₂ SO ₄)	0	-	4%
과붕산나트륨 (NaBO ₃ ·H ₂ O)	8	-	16%
TAED	2	-	8%
포스페이트 (예를들어 EDTMPA)	0	-	1%
카르복시메틸셀룰로스	0	-	2%
중합체(예를들어 말레산/아크릴산 공중합체, PVP, PEG)	0	-	3%
효소	0	-	5%
소량성분(예를들어, 거품억제제, 향료, 증백제)	0	-	5%

(4) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

선형 알킬벤젠설포네이트 (산성으로 계산)	8	- 12%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO)	10	- 25%
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	14	- 22%
용해성 규산염 (Na ₂ O, 2SiO ₂)	1	- 5%
지올리트 (NaAlSiO ₄)	25	- 35%
황산나트륨 (Na ₂ SO ₄)	0	- 10%
카르복시메틸셀룰로스	0	- 2%
중합체(예를들어 말레산/아크릴산 공중합체, PVP, PEG)	1	- 3%
효소	0	- 5%
소량성분(예를들어, 거품 억제제, 향료)	0	- 5%

(5) 다음으로 이루어지는 수성액체세제조성물

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	15	- 21%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO 또는 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 5 EO)	12	- 18%
지방산 같은 비누 (예를들어 올레산)	3	- 13%
알케닐숙신산	0	- 13%
아미노에탄올	8	- 18%
시트르산	2	- 8%
포스페이트	0	- 3%
중합체(예를들어 PVP, PEG)	0	- 3%
보레이트 (B ₄ O ₇)	0	- 2%
에탄올	0	- 3%
프로필렌 글리콜	8	- 14%
효소	0	- 5%
소량성분(예를들어 분산제, 거품억제제, 향료, 증백제)	0	- 5%

(6) 다음으로 이루어지는 수성구조의 액체세제조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	15	- 21%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO, 또는 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 5 EO)	3	- 9%
지방산 같은 비누 (예를들어 올레산)	3	- 10%
지올리트 (NaAlSiO ₄)	14	- 22%
시트르산 칼륨	9	- 18%
보레이트 (B ₄ O ₇)	0	- 2%
카르복시매틸셀룰로스	0	- 2%
중합체 (예를들어 PEG, PVP)	0	- 3%
예를들어 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체 같은 중합체를 고정; 몰비 25:1 ; 분자량 3800	0	- 3%
글리세롤	0	- 5%
효소	0	- 5%
소량성분 (예를들어 분산제, 거품 억제제, 향료, 증백제)	0	- 5%

(7) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

지방 알코올 술페이트	5	- 10%
에톡시화된 지방산 모노에탄올아미드	3	- 9%
지방산 같은 비누	0	- 3%
탄산나트륨 (Na_2CO_3)	5	- 10%
용해성 규산염 (Na_2O , 2SiO_2)	1	- 4%
지올리트 (NaAlSiO_4)	20	- 40%
황산나트륨 (Na_2SO_4)	2	- 8%
과붕산나트륨 ($\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	12	- 18%
TAED	2	- 7%
중합체 (예를들어 말레산/아크릴산 공중합체, PEG)	1	- 5%
효소	0	- 5%
소량성분 (예를들어 증백제, 거품억제제, 향료)	0	- 5%

(8) 다음으로 이루어지는 과립상으로 조제된 세제조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	8	- 14%
에톡시화된 지방산 모노에탄올아미드	5	- 11%
지방산 같은 비누	0	- 3%
탄산나트륨 (Na_2CO_3)	4	- 10%
용해성 규산염 (Na_2O , 2SiO_2)	1	- 4%
지올리트 (NaAlSiO_4)	30	- 50%
황산나트륨 (Na_2SO_4)	3	- 11%
시트르산 나트륨 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)	5	- 12%
중합체 (예를들어 PVP, 말레산/아크릴산 공중합체 효소, PEG)	1	- 5%
효소	0	- 5%
소량성분 (예를들어 거품 억제제, 향료)	0	- 5%

(9) 다음으로 이루어지는 과립상으로서 조제된 세제조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	6	- 12%
비이온성 계면활성제	1	- 4%
지방산 같은 비누	2	- 6%
탄산나트륨 (Na_2CO_3)	14	- 22%
저올리트 (NaAlSiO_4)	18	- 32%
황산나트륨 (Na_2SO_4)	5	- 20%
시트르산 나트륨 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)	3	- 8%
과붕산 나트륨 ($\text{NaBO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$)	4	- 9%
광택 활성제 (예를들어 NOBS 또는 TAED)	1	- 5%
카르복시메틸셀룰로스	0	- 2%
중합체 (예를들어 폴리카르복실레이트 또는 PEG)	1	- 5%
효소	0	- 5%
소량성분 (예를들어 증백제, 향료)	0	- 5%

(10) 다음으로 이루어지는 수성액체 세제조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	15	- 23%
알코올 에톡시술포네이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 2-3 EO)	8	- 15%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO 또는 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 5 EO)	3	- 9%
지방산 같은 비누 (예를들어 라우르산)	0	- 3%
아미노에탄올	1	- 5%
시트르산 나트륨	5	- 10%
히드로트로프 (예를들어 톨루엔술포산나트륨)	2	- 6%
보레이트 (B ₄ O ₇)	0	- 2%
카르복시메틸셀룰로스	0	- 1%
에탄올	1	- 3%
프로필렌 글리콜	2	- 5%
효소	0	- 5%
소량성분 (예를들어 중합체, 분산제, 향료, 증백제)	0	- 5%

(11) 다음으로 이루어지는 수성액체 세제조성물.

선형 알킬벤젠술포네이트 (산성으로 계산)	20	- 32%
알코올 에톡실레이트 (예를들어 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO 또는 C ₁₂₋₁₅ 알코올, 5 EO)	6	- 12%
아미노에탄올	2	- 6%
시트르산	8	- 14%
보레이트 (B ₄ O ₇)	1	- 3%
중합체 (예를들어 말레산/아크릴산 공중합체, 예를 들어 라우릴메타크릴레이트/아크릴산 공중합체 같은 공중합체를 고정)	0	- 3%
글리세롤	3	- 8%
효소	0	- 5%
소량성분(예를들어 히드로트로프, 분산제, 향료, 증백제)	0	- 5%

(12) 다음으로 이루어지는 적어도 600g/l의 부피밀도를 갖는 과립상으로서 조제된 세제 조성물.

음이온성 계면활성제 (선형알킬벤젠술포네이트, 알킬 술포이트, 알파-올레핀술포네이트, 알파-술포지방산 메틸에스테르, 알칸술포네이트, 비누)	25	- 40%
비이온성 계면활성제 (예를들어 알코올 에톡실레이트)	1	- 10%
탄산나트륨 (Na_2CO_3)	8	- 25%
용해성 규산염 (Na_2O , 2SiO_2)	5	- 15%
황산나트륨 (Na_2SO_4)	0	- 5%
지올리트 (NaAlSiO_4)	15	- 28%
과붕산나트륨 ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0	- 20%
표백 활성제 (TAED 또는 NOBS)	0	- 5%
효소	0	- 5%
소량성분 (예를들어 향료, 증백제)	0	- 3%

(13) 선형 알킬벤젠술포네이트의 전부 또는 부분을 (C_{12-18})알킬술포네이트로 치환한 1)-(12)

에 기술된 바와 같은 세제조제물.

(14) 안정화되고 캡슐화된 과산을 이미 명시된 표백계를 위한 추가의 성분 또는 치환물로서 하나를 함유하는 (1)-(15)에 기술된 세제 조성물.

(15) 과불산염을 과탄산염으로 치환한 (1), (3), (7), (9) 및 (12)에 기술된 세제 조성물.

(16) 예를들어 선형 알콕시화된 1차 알코올, 빌더 시스템(예: 포스페이트), 효소 및 알칼리 같은 액체 비이온성 계면활성제로 이루어지는 비수성 세제액으로 조제된 세제 조성물. 또한 세제는 음이온성 계면활성제 및/또는 표백 시스템으로 이루어질 수 있다.

본 발명의 리파제 변이체는 세제에 종래적으로 사용된 농도로 포함될 수 있다.

본 발명의 세제 조성물에서, 본 발명의 리파제 변이체는 세척수의 리터당 리파제 변이체 0.00001-1mg(순수 효소 단백질로 계산)에 대응하는 양으로 첨가할 수 있다고 현재 생각된다.

식기 세척 조성물

식기 세척 세제 조성물은 음이온성, 비이온성, 양이온성 양쪽성 또는 이들 유형의 혼합물일 수 있는 계면활성제로 이루어진다. 세제는 0-90%의 저- 또는 비-발포(發泡)에톡시화된 프로폭시화된 직쇄 알코올 같은 비이온성 계면활성제를 함유할 것이다.

세제 조성물은 무기 및/또는 유기 유형의 세제 빌더 염을 함유할 수 있다.

세제 빌더는 인-함유 및 비-인 함유 유형으로 세분될 수 있다.

일반적으로 세제 조성물은 1-90%의 세제 빌더를 함유한다.

인-함유 무기 알칼리성 세제 빌더의 예는 존재할 때 수용성 염 특히 알칼리 금속 피로포스페이트, 오르토포스페이트, 폴리포스페이트, 및 포스포네이트를 포함한다.

비-인-함유 무기 빌더의 예는 존재할 때 수용성 알칼리 금속 탄산염, 붕산염 및 규산염 뿐만 아니라 수불용성 결정형 또는 무정형 알루미늄 규산염의 다양한 유형을 포함하는데

지올리트가 가장 잘 알려진 대표적인 것이다.

적당한 유기 발더의 예는 알칼리 금속, 암모늄 및 치환된 암모늄 시트레이트, 숙시네이트, 말로네이트, 지방산 술포네이트, 카르복시메톡시숙시네이트, 암모늄 폴리아세테이트, 카르복실레이트, 폴리카르복실레이트, 아미노 폴리카르복실레이트, 폴리아세틸 카르복실레이트 및 폴리히드록스술포네이트를 포함한다.

다른 적당한 유기 발더는 발더 성질을 갖는 것으로 알려진 고분자량 중합체 및 공중합체, 예를들어 적당한 폴리아크릴산, 폴리말레산 및 폴리아크릴산/폴리말레산 공중합체 및 그것의 염을 포함한다.

식기 세척 세제 조성물은 염소/브롬-유형 또는 산소-유형의 표백제를 함유할 수 있다. 무기 염소/브롬-유형 표백제의 예는 염소화된 삼인산나트륨 뿐만 아니라 리튬, 나트륨 또는 칼슘 하이포클로리트 및 하이포브로미트이다. 유기 염소/브롬-유형 표백제의 예는 트리클로로이소시아누르산, 트리브로모이소시아누르산, 디브로모이소시아누르산, 및 디클로로이소시아누르산, 및 칼륨과 나트륨 같은 수용성 양이온과의 그것의 염이다.

산소 표백제는 예를들어 표백 전구물질 또는 퍼옥시산 화합물과의 무기과염의 형태인 것이 바람직하다. 적당한 퍼옥시 표백 화합물의 전형적인 예는 알칼리금속 과붕산염, 4 수화물 및 일 수화물 둘다, 알칼리 금속 과탄산염, 과규산염 및 과인산염이다. 바람직한 활성제의 재료는 TAED와 글리세롤 트리아세테이트이다.

본 발명의 식기 세척 세제 조성물은 효소를 위한 종래의 안정화제, 예를들어 프로필렌 글리콜 같은 폴리올, 당 또는 당알코올, 락트산, 붕산 또는 방향족 붕산 에스테르 같은 붕산 유도체를 사용하여 안정화될 수 있다.

또한 식기 세척 세제 조성물은 다른 효소, 보다 구체적으로 아밀라제, 프로테아제 및/또는 셀룰라제로 이루어질 수 있다.

또한 본 발명의 식기 세척 세제 조성물은 다른 종래의 세제 성분, 예를들어 해교제

(解膠劑), 충전제, 거품억제제, 부패방지제, 흡연탄제, 격리제, 흙 재침전방지제, 탈수제, 염료, 살균제, 형광제, 농화제 및 향료를 함유할 수 있다.

최종적으로, 본 발명의 변이체는 종래의 식기세척제, 예를들어 다음의 특허 공개

공보중의 어떤 것에 기술된 세제의 어떤 것에도 사용될 수 있다:

EP 551670, EP 533239, WO 9303129, EP 507404, US 5141664, GB 2247025, EP 414285, GB 2234980, EP 408278, GB 2228945, GB 2228944, EP 387063, EP 385521, EP 373851, EP 364260, EP 349314, EP 331370, EP 318279, EP 318204, GB 2204319, EP 266904, US 5213706, EP 530870, CA 2006687, EP 481547, EP 337760, WO 93/14183, US 5223179, WO 93/06202, WO 93/05132, WO 92/19707, WO 92/09680, WO 92/08777, WO 92/06161, WO 92/06157, WO 92/06156, WO 91/13959, EP 399752, US 4941988, US 4908148.

더구나, 본 발명의 변이체는 연화 조성물에 사용될 수 있다:

리파제 변이체는 예를들어 Surfactant and Consumer Products, (J. Falbe 출판, 1987, pp 295-296); Tenside Surfactants Detergents, 30 (1993), 6, pp 394-399; JAOCs, Vol. 61 (1984), 2, pp 367-376; EP 517 762; EP 123 400; WO 92/19714; WO 93/19147; US 5,082,578; EP 494 769; EP 544 493; EP 543 562; US 5,235,082; EP 568 297; EP 570 237.

에 기술된 바와 같이 식물연화제에 사용될 수 있다.

본 발명은 청구된 본 발명의 범위를 한정하지 않는 다음의 실시예에서 더 기술된다.

재료 및 방법

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen 및 Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig, Federal Republic of Germany에서 구입할 수 있는 Humicola lanuginosa DSM 4109.

실시예 1

Aspergillus oryzae에서 Humicola lanuginosa 리파제의 발현

Humicola lanuginosa 리파제의 클로닝은 EP 305216에 기술된다. 또한 Aspergillus

oryzae에서 리파제의 발현 및 특성을 기술한다. 사용된 발현 플라스미드는 p960으로 명명된다.

본 출원에 사용된 발현 플라스미드는 p960과 동일하지만, 리파제의 암호부위에 대해 부변형 3'만 제외시킨다. 변형을 다음의 방법으로 만들었다: p960을 NruI 및 BamHI 제한효소로 분해시켰다. 이들 2개의 부위 사이에서 플라스미드 pBR322로부터 BamHI/NheI 단편을 (여기서 NheI 단편을 Klenow 폴리머라제로 채운다) 클로닝화시키고 그것에 의해 유일한 BamHI 및 NheI 부위를 함유하는 플라스미드 pA01을 만들었다 (제1도). 이들 유일한 부위 사이에서 p960으로부터 BamHI/XbaI 단편을 클로닝화하여 pAHL을 얻었다 (제2도).

시험관내에서 부위지정된 리파제 유전자의 돌연변이 유발

리파제 유전자를 돌연변이를 도입하는데 사용된 접근은 Nelson 및 Long, Analytical Biochemistry (180, 147-151(1989))에 기술된다. 이것은 PCR-반응에서 개시제중의 하나로 화학적으로 합성된 DNA-가닥을 사용함으로써 도입된 원하는 돌연변이를 함유하는 PCR (폴리머라제 연쇄반응) 단편의 3단계-발생을 포함한다. PCR발생 단편으로부터, 돌연변이를 수반하는 DNA 단편을 제한효소로 절단하여 분리시키고 발현 플라스미드로 재-삽입시킬 수 있다. 이 방법은 실시예 5에서 충분히 기술된다. 제4도 및 5도에서 방법은 더 설명된다.

Humicola lanuginosa 리파제의 N94K/D96A 유사체를 발현하는 플라스미드의 구조물 플라스미드 pAHL의 선형화

원형 플라스미드 pAHL을 다음의 50 μ l 반응혼합물중의 제한효소 SphI로 선형화시킨다: 50mM NaCl, 10mM 트리스-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM 디티오프레이톨, 1 μ g 플라스미드 및 SphI의 2단위. 분해를 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 실행시킨다. 반응혼합물을 페놀로 추출하고 (트리스-HCl로 평형이 되게함, pH 7.5) 병냉 96%의 에탄올의

2부피를 가하여 침전시킨다. 원심분리 및 펠렛의 건조후에, 선형화된 DNA를 50 μ l H₂O에 용해시키고 농도는 아가로스겔로 측정하였다.

3-단계 PCR 돌연변이 유발

제5도에 나타낸 바와 같이, 3-단계 돌연변이 유발은 4개의 개시제의 사용을 포함한다.

돌연변이유발 개시제 (=A) : 5'-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTC-
CCGAT-3'

PCR 조제 1 (=B) : 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTACCTATTAA-
ATCGGC-3'

PCR 조제 2 (=C) : 5'-CCATGGCTTTTACGGTGTCT-3'

PCR 처리제 (=D) : 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

조제 1 및 조제 2는 암호부위 밖의 서열을 보충하고, 따라서 변이체 서열의 구조물에
서 어떤 돌연변이유발 개시제와 조합하여 사용할 수 있다.

모든 3단계를 다음을 함유하는 완충액에서 실시시킨다: 10mM 트리스-HCl, pH 8.3, 50
mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% 젤라틴, 0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dGTP,
0.2mM TTP, 2.5 단위의 타크(Taq) 폴리머라제.

단계 1에서, 100pmol 개시제 A, 100pmol 개시제 B 및 1fmol 선형 플라스미드를 전체
100 μ l 반응혼합물에 가하고 95 $^{\circ}$ C에서 2분, 37 $^{\circ}$ C에서 2분 및 72 $^{\circ}$ C에서 3분으로 이루어지
는 15사이클을 실시시킨다.

PCR 생성물의 농도는 아가로스겔로 측정한다. 다음에, 단계 2를 실시시킨다.

0.6pmol 단계 1의 생성물 및 1 fmol 선형 플라스미드를 전체 100 μ l의 상기 언급한 완충
액에 함유시키고 95 $^{\circ}$ C에서 5분, 37 $^{\circ}$ C에서 2분 및 72 $^{\circ}$ C에서 10분으로 이루어지는 1사이클
을 실행한다.

단계 2의 반응혼합물에, 100pmol 개시제 C와 100pmol 개시제 D를 첨가하고 (각각 1 μ l

씩), 95℃에서 2분, 37℃에서 2분 및 72℃에서 3분으로 이루어지는 20사이클을 실행한다.

이 조작은 돌연변이유발 방법 중의 단계 3으로 이루어졌다.

돌연변이된 제한 단편의 분리

단계 3의 생성물을 아가로스겔로부터 분리시키고 20 μ l H₂O에 재용해시킨다. 다음
에, 전체부피 50 μ l의 다음 조성물중의 제한효소 BamHI 및 BstXI로 분해시킨다: 100mM
NaCl, 50mM 트리스-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 10단위의 BamHI 및 10
단위의 BstXI. 배양은 2시간 동안 37℃에서 한다. 733bp BamHI/BstXI 단편을
아가로스겔로부터 분리시킨다.

발현벡터 pAHL의 연결

발현 플라스미드 pAHL을 상기 지정된 조건하에서 BamHI 및 BstXI로 절단하고 큰
단편을 아가로스겔로부터 분리시킨다. 이 벡터에, 상기 분리시킨 돌연변이 단편을
연결시키고 연결 혼합물을 *E. coli*로 형질전환하기 위해 사용한다. 단편의 존재 및
배향은 제한효소와의 형질전환체로부터 플라스미드 제조물의 절단으로 입증된다. 서열
분석을 ABI 서열기, 모델 373A에서 DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing 키트
(응용된 바이오시스템)를 사용하여 접-가닥의 플라스미드에서 실행한다. 플라스미드
를 pAHLG91A/N94K/D96A로 명명하고, pAHL과 동일하지만 치환된 코돈은 제외시킨다.

실시예 2

Humicola 리파제의 다른 변이체를 발현시키는 플라스미드의 구조물

다음의 변이체는 실시예 3에서 기술된 동일한 방법을 사용하여 구성된다. 플라스
미드 이름과 변형에 사용된 개시체는 하기에서 열거된다.

플라스미드 이름

개시체 A의 서열

pAHL83T/N94K/D96A 5'-ATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTCCCGATCCAGTTC-
TCTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'

pAHL87K/D96V 5-TATTTCTTTCAAAACGAAGTTAAGATTCCCGATCCAGTTC-
TTTATGGAACGAGA-3'

PAHLE87K/G91A/D96A 5'-TATTTCTTTCAAAGCGAAGTTAAGATTAGCGATCCAGTT-
 CTTTATGGAACGAGA-3'
 PAHLN94K/F95L/D96H 5'-TATTTCTTTCAAGTGCAACTTAAGATTCCCGAT-3'
 PAHLF95C/D96N 5'-TATTTCTTTCAAGTTACAGTTAAGATTCCC-3'
 PAHLG91S/L93V/F95C 5'-TATTTCTTTCAAGTCACAGTTAACATTAGAGATCCAGTT-
 CTC-3'
 PAHLE87K/G91A/L93I/N94K/D96A
 5'-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAATATTAGCGATCCAGTT-
 CTTTATGGAACGAGA-3'
 PAHLD167G 5'-ATATGAAAACACACCGATATCATACCC-3'
 PAHLA121V 5'-CCTTAACGTATCAACTACAGACCTCCA-3'
 PAHLR205K/E210Q 5'-GCTGTAACCGAATTGGCGCGGCGGAGCTTAGGGACAAT-
 ATC-3'
 PAHLN73D/S85T/E87K/G91A/N94K/D96A
 5'-TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTAGCGATCCAGTT-
 CTTTATAGTACGAGAGCCACGGAAAGAGAGGACGATCAATTT-
 GTCCGTGTTGTCGAG-3'
 PAHLS83T/E87K/W89G/G91A/N94K/D96V
 5'-TATTTCTTTCAAACGAACTTAAGATTAGCGATACCGTT-
 CTTTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'
 PAHLE87K/G91A/D96R/I100V
 5'-GCAAATGTCATTAACTTCTTTCAATCTGAAGTTAAGATT-
 AGCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
 PAHLS83T/E87K 5'-CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'
 PAHLE87K/G91A 5'-GAAGTTAAGATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
 PAHLS83T/E87K 5'-CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'
 PAHLQ249R 5'-CGGAATGTTAGGTCTGTTATTGCCGCC-3'

실시예 3

Humicola 리파제의 조합 유사체를 발현시키는 플라스미드의 구조물

플라스미드 PAHLD167G/E210V
 PAHLA121V/R205K/E210Q
 및 PAHLS83T/E87K/Q249R

은 적당한 개시제를 사용하여 2개의 연속적인 돌연변이유발 단계를 실행함으로써 구성된다.

실시예 4

Aspergillus 중의 리파제 유사체의 발현

Aspergillus oryzae의 형질전환 (일반 방법)

100ml의 YPD (Sherman et al., Yeast Genetics의 방법, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981)를 A. oryzae의 포자로 접종시키고 약 24시간 동안 흔들어주면서 배양한다. 균사를 미라클로드(miracloth)를 통한 여과로 얻고 200ml의 0.6M $MgSO_4$ 로 세척한다.

균사를 15ml의 1.2M $MgSO_4$, 10mM NaH_2PO_4 , pH = 5.8에서 현탁시킨다. 현탁액을 얼음에서 냉각시키고 120mg의 Novozym 234, batch 1687을 함유하는 1ml의 완충액을 첨가한다. 5분후에, 1ml의 12mg/ml BSA (시그마유형 H25)를 첨가하고 샘플을 현미경하에서 관찰할 때 많은 원형질체가 보일때까지 37℃에서 1.5-2.5시간 동안 계속하여 온화하게 휘저어 배양을 한다.

현탁액을 미라클로드를 통하여 여과시키고 여과액을 살균 튜브에 옮기고 5ml의 0.6M 소르비톨, 100mM 트리스-HCl (pH = 7.0)을 넣었다. 원심분리는 1000g에서 15분 동안 실행시키고 원형질체를 $MgSO_4$ 완충물의 윗부분으로부터 수집한다. 2부피의 STC (1.2M 소르비톨, 10mM 트리스-HCl, pH = 7.5, 10mM $CaCl_2$)를 원형질체의 현탁액에 가하고 혼합물을 1000g에서 5분 동안 원심분리시킨다. 원형질체 펠렛을 3ml의 STC에 재현탁시키고 재펠렛시킨다. 이 조작을 반복한다. 최종적으로 원형질체를 0.2-1ml의 STC에 재현탁시킨다.

100 μ l의 원형질체 현탁액을 100 μ l의 STC중의 5-25 μ g의 p3SR2 Hynes et al., Mol. 및 Cel. Biol. Vol. 3, No. 8, 1430-1439, 1983년 8월에 기술된 플라스미드를 수반하는 A. nidulans amdS 유전자) 혼합액을 실온에서 25분 동안 방치한다. 0.2ml의 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10mM $CaCl_2$ 및 10mM 트리스-HCl (pH = 7.5)을 가하고 조심스럽게 혼합하고 (2번), 최종적으로 0.85ml의 동일한 용액을 첨가하고 조심스럽게 혼합시킨다. 혼합액을 실온에서 25분 동안 방치하고, 2500g에서 15분 동안 회전시키고

펠렛을 2ml의 1.2M 소르비톨에 재현탁시킨다. 약간의 침전 후에 원형질체를 1.0M 자당, pH = 7.0, 질소 원천으로서의 10mM의 아세트아미드 및 배경성장을 억제하기 위한 20mM의 CsCl을 함유하는 최소의 플레이트에 편평하게 펼친다(Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56). 4-7일 동안 37°C에서 배양한 후에 포자를 고르고, 살균수에 현탁시키고 단일 콜로니를 편평하게 한다. 이 방법을 반복하고 두번째의 재분리 이후에 단일 콜로니의 포자를 한정된 형질전환체로서 저장한다.

A. oryzae 중의 리파제 유사체의 발현

상기한 플라스미드를 상기 실시예에 기술된 바와 같이 A. nidulans로부터 amdS 유전자를 함유하는 p3SR2와의 형질전환에 의한 A. oryzae IFO 4177로 형질전환시킨다. 상기한 바와 같이 제조된 원형질체를 동등한 양의 발현 플라스미드와 p3SR2의 혼합물로 배양시키고, 약 5 μ g의 각각을 사용한다. 단독의 질소 원천으로 아세트아미드를 사용할 수 있는 형질전환체를 2번 재분리시킨다. 3일 동안 YPD에서 성장시킨 후에 배양 상청액을 리파제 활성에 대한 분석법을 사용하여 분석한다. 좀더 연구하기 위해 가장 좋은 형질전환체를 선택하고 30°C에서 4일 동안 200ml FG4 배지(3% 콩가루, 3% 말토덱스트린, 1% 펩톤, 4M NaOH로 7.0으로 조정된 pH)로 1L 교반-플라스크에서 성장시킨다.

실시예 5

본 발명의 리파제 변이체의 발현

리파제 활성에 대한 분석:

리파제에 대한 기질을 유화제로 아라비아 고무를 사용하여 트리부티르산글리세린(MERCK)을 유화시킴으로써 제조하였다.

리파제 활성을 pH 정역학 방법을 사용하여 pH 7에서 분석하였다. 리파제 활성의 한 단위(LU/mg)를 분당 1 μ M 지방산을 유리시키기 위해 필요한 양으로서 정의하였다.

단계 1: 발효 상청액을 원심분리하고, 침전물은 버린다. 상청액의 pH를 7로 조정하고 같은 부피의 냉 96% 에탄올을 조금씩 가한다. 혼합물을 얼음욕에서 30분 동안 유지시키게 한다. 원심분리하고 침전물을 버린다.

단계 2: -이온 교환 크로마토그래피. 상청액을 여과하고 50mM 트리스-아세트이트 완충액(pH7)으로 평형을 이룬 DEAE-고속흐름(조제 TM) 관에 적용한다. 관을 같은 완충액으로 세척하고 280nm에서 흡수가 될 때까지 0.05OD 보다 더 낮게한다. 5개의 관 부피를 사용하여 같은 완충액중의 선형 염구배(0-0.5M NaCl)로 묶인 효소활성을 용리한다. 효소활성을 함유하는 단편을 모은다.

단계 3: -소수 크로마토그래피. 효소활성을 함유하는 푸울의 물농도를 고체 암모늄 아세테이트를 가함으로써 0.8M로 조정한다. 효소를 0.8M 암모늄 아세테이트로 미리 평형을 이룬 TSK 겔 Butyl-Toyopearl 650C 란(Tosoh Corporation Japan에서 구입)에 적용한다. 0.8M 암모늄 아세테이트로 풀린 물질을 세척하고 증류수로 묶인 물질을 용리한다.

단계 4: -리파제 활성을 함유하는 푸울을 콘덕턴스를 2ms에 조정하기 위해 물로 증류한다. 푸울을 50mM 트리스-아세트이트 완충액(pH7)으로 미리 평형을 이룬 고성능 Q 세파로스 (조제)관에 적용한다. 선형 염구배로 묶인 효소를 용리한다.

실시예 6

본 발명의 리파제의 변이체의 세척성능

본 발명의 *Humicola lanuginosa* 리파제 변이체의 세척성능을 야생형 *H. lanuginosa* 리파제와 비교하여 OD₂₈₀에 따른 리터당 단백질(mg)의 효소 사용량의 기제에서 평가하였다.

세척시험을 항온의 물욕에 놓인 150ml의 비이커에서 실행하였다. 비이커를 3각형의 자석 막대기로 교반시켰다.

실험조건은 다음과 같았다:

방법: 각 사이클 사이에 하룻밤 건조시키는 3사이클

세척액: 비이커당 100ml

건본: 비이커당 6개의 건본(3.5×3.5cm)

섬유: 100% 면, 시험섬유 모양 #400

일록: Sudan red로 염색된 라드(라드의 0.75mg 염료/g). 70℃로 가열된 6μl의 라드를 각 건본의 중앙에 적용시켰다. 일록의 적용 후에, 건본을 오븐에서 75℃에서 30분 동안 가열하였다. 다음에 건본을 첫번째 세척을 하기 전에 실온에서 하룻밤 보관하였다.

세제: LAS (Nansa 1169/P, 30% a.m.)	1.17g/ℓ
AEO (Dobanol™ 25-7)	0.15g/ℓ
3인산나트륨	1.25g/ℓ
황산나트륨	1.00g/ℓ
탄산나트륨	0.45g/ℓ
규산나트륨	0.15g/ℓ

pH: 10.2

리파제농도: 리터당 리파제 단백질의 0.075, 0.188, 0.375, 0.75 및 2.5mg

시간: 20분

온도: 30℃

행구기: 흐르는 물에서 15분

건조: 실온에서 하룻밤(∼20℃, 30-50% RH)

평가: 3번째 세척후, 460nm에서 반사율을 측정하였다.

결과

사용량-반응곡선을 리파제 변이체와 원래의 *H. lanuginosa* 리파제를 비교하였다.

사용량-반응곡선을 다음 식의 측정된 데이터로 정함으로써 계산하였다.

$$\Delta R = \Delta R_{\text{최대}} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \quad (I)$$

여기서 ΔR 은 반사율 단위에서 나타난 효과

C 는 효소농도(mg/ℓ)

$\Delta R_{\text{최대}}$ 은 최대효과를 나타내는 상수

K 는 상수; K^2 는 최대효과의 절반을 얻은 효소농도를 나타낸다.

야생형 리파제 뿐만아니라 특성 상수 $\Delta R_{\text{최대}}$ 및 각 리파제 변이체를 위해 밝혀진 K 에 근거하여 개선인자를 계산하였다. 다음과 같이 정의된 개선인자는

$$f_{\text{개선}} = C_{WT}/C \quad (II)$$

$0.25\text{mg}/\ell$ 의 관련 야생형 단백질(C_{WT})로 얻은 것과 같은 동등 효과를 얻기 위해 필요한 리파제 변이체 단백질의 양을 나타낸다. 따라서, 개선인자를 계산하는 방법을 다음과 같이 하였다.

- 1) $0.25\text{mg}/\ell$ 에서 야생형 단백질의 효과($\Delta R_{\text{야생형}}$)를 식 (I)을 사용하여 계산하였다.
- 2) $0.25\text{mg}/\ell$ 에서 야생형과 같은 동등효과를 초래하는 리파제 변이체의 농도를 다음 식을 사용하여 계산하였다.

$$C = \left(K_{(\text{유사체})} \frac{\Delta R_{\text{최대(야생형)}}}{\Delta R_{\text{최대(야생형)}} - \Delta R_{(\text{야생형})}} \right)^2 \quad (III)$$

- 3) 개선인자를 식 (II)를 사용하여 계산하였다.

결과는 다음의 표 1에 나타낸다.

표 1

변이체	개선인자
E87K/D96V	1.2
S83T/N94K/D96N	2.3
D94K/D96A	2.7
E87K/G91A/D96A	2.6
N94K/F95L/D96H	3.3
D167G,E210V	5.0
E87K,G91A,L93I,N94K,D96A	1.3
E87K,G91A,D96R,I100V	5.2
E87K,G91A	5.0

본 명세서에 인용된 참조문헌

- Shimada, Y. et al. (1989). cDNA Molecular Cloning of *Geotrichum candidum* Lipase. *J. Biochem.*, 106, 383-388.
- Yamaguchi, S. et al. (1991). Cloning and structure of the mono- and diglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150. *Gene* 103, 61-67.
- Hass, M.J. et al. (1991). Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*. *Gene* 109, 107-113.
- Kugimiya, W. et al. (1992). Cloning and Sequences Analysis of DNA encoding *Rhizopus niveus* Lipase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 716-719.
- Dartois, V. et al. (1993). Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochimica et Biophysica acta* 1131, 253-260.
- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989.
- R.K. Saiki et al., *Science* 239, pp. 487-491, 1988.
- Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, pp. 1859-1869, 1981.
- Matthes et al., *The EMBO J.* 3, pp. 801-805, 1984.
- Hudson et al., *Practical Immunology*, Third edition, Blackwell Scientific Publications, 1989
- J. Falbe, 1987, pp 295-296; *Tenside Surfactants Detergents*, 30 (1993), 6, pp 394-399; *JAOCS*, Vol. 61 (1984)
- Nelson & Long, *Analytical Biochemistry*, 180, 147-151 (1989)
- Sherman et al., *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981

특허청구의 범위

1. 아미노산 잔기 21-27, 145-147, 174 또는 226-227에 의해 정의된 부위중 적어도 한 곳에서의 돌연변이를 지니는, 균주 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제 또는 상기 리파제의 유사체의 변이체.
2. 다음의 위치중 적어도 한 곳에서의 돌연변이로 이루어지는 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제 또는 상기 리파제의 유사체의 변이체인 것을 특징으로 하는 변이체.

S83, E87, N94, A121, D167, R205.

3. 제 2항에 있어서, 다음의 돌연변이중 적어도 하나로 이루어지는 것을 특징으로 하는 변이체:

S83T, E87K, N94K, A121V, D167G, R205K.

4. 다음의 돌연변이중 적어도 하나로 이루어지는 DSM 4109로부터 얻을 수 있는 *H. lanuginosa* 리파제 또는 그의 유사체의 변이체:

N94K+D96A
S83T+N94K+D96N
E87K+D96V
E87K+G91A+D96A
N94K+F95L+D96H
A121V+R205K+E210Q
F95C+D96N
G91S+L93V+F95C
E87K+G91A+D96R+I100V
E87K+G91A
E83T+E87K+Q249R
S83T+E87K+Q249R
S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D94A
E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
D167G+E210V

5. 제 1항 내지 4항중의 어느 한 항에 따른 *H. lanuginosa* 리파제 변이체를 암호화하는

DNA서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 DNA 구조물.

6. 제 5항에 따른 DNA구조물을 분비하는 벡터.
7. 제 6항에 있어서, 플라스미드 또는 박테리오파지인 것을 특징으로 하는 벡터.
8. 제 7항에 있어서, 리파제 변이체의 발현을 허용하는 DNA서열을 더 포함하는 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 벡터.
9. 제 5항에 따르는 DNA 구조물 또는 제 6항 내지 제 8항중의 어느 한 항을 따른 벡터를 분비하는 숙주세포.
10. 제 9항에 있어서, 미생물 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
11. 제10항에 있어서, 균류 또는 박테리아 균주의 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
12. 제11항에 있어서, *A. niger*, *A. oryzae* 및 *A. nidulans* 같은 *Aspergillus* 속의 세포, 또는 *S.cereviciae* 같은 *Saccharomyces* 속의 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
13. 제11항에 있어서, 그람-양성의 박테리아 균주의 세포, 예를들어,
Bacillus subtilis, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus thuringiensis* 또는 *Streptomyces lividans* 또는 *Stretomyces murinus*.
같은 *Bacillus* 속의 세포, 또는 *E. coli* 같은 그람-음성의 박테리아 균주의 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
14. 변이체를 발현하기에 적당한 조건하에서 제 9항 내지 제13항중의 어느 항에 따른 숙주세포를 배양하고 배양물로부터 발현된 변이체를 회수하는 것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제 1항 내지 제 4항중의 어느 한 항을 따른 리파제 변이체를 제조하는 방법.
15. 임의로 비-분진성 과립, 안정화된 액체 또는 보호된 효소의 형태로, 제1항 내지

제 4항중의 어느 항에 따른 리파제 변이체로 이루어지는 세제 첨가제.

16. 제15항에 있어서, 첨가제 g당 효소 단백질 0.02-200mg을 함유하는 것을 특징으로

하는 세제 첨가제.

17. 제15항 또는 제16항에 있어서, 프로테아제, 아밀라제, 퍼옥시다제, 쿠티나제, 리파제

및/또는 셀룰라제 같은 또다른 효소를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세제

첨가제.

18. 제 1항 내지 제4항중의 어느 한 항에 따른 리파제 변이체로 이루어지는 세제 조성

물.

19. 제18항에 있어서, 추가로 프로테아제, 아밀라제, 퍼옥시다제, 쿠티나제, 리파제 및/

또는 셀룰라제 같은 또다른 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 세제 조성물.